

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Beeinflussung mikrosomaler Enzyme der Ratten-
leber durch Spironolacton, Etacrynsäure,
Furosemid und Aldosteron

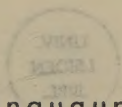
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Peter Rawer
aus Heidelberg

1974

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Beeinflussung mikrosomaler Enzyme der Ratten-
leber durch Spironolacton, Etacrynsäure,
Furosemid und Aldosteron


Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Peter Rawer
aus Heidelberg

1974



Dekan :

Prof. Dr. D. Ringleb

1. Berichterstatter :

Prof. Dr. H.W. Leber

2. Berichterstatter :

Prof. Dr. H.-U. Schulze

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Zusammenfassung	5
Einleitung	7
A Eigene Untersuchungen	8
1. Langzeitversuche	8
2. Kurzzeitversuche	8
3. Versuche zur Aufklärung des Induktionsmechanismus	9
4. Versuche mit Aldosteron	9
5. In-Vitro-Versuch	10
B Vorbehandlung und Methoden	11
1. Versuchstiere	11
2. Vorbehandlung der Tiere	11
2.1. Vorbehandlung mit Spironolacton	11
2.2. Vorbehandlung mit Actinomycin D	12
2.3. Vorbehandlung mit Actinomycin D und Spironolacton	12
2.4. Vorbehandlung mit Etacrynsäure	12
2.5. Kombinierte Behandlung mit Etacrynsäure und Spironolacton	13
2.6. Vorbehandlung mit Furosemid	13
2.7. Kombinierte Behandlung mit Furosemid und Spironolacton	13
2.8. Vorbehandlung mit Aldosteron	13
2.9. Vorbehandlung der Kontrolltiere	14
3. Töten und Verarbeitung der Tiere	15
4. Homogenisierung und Zellfraktionierung	15
5. Bestimmung des Proteingehaltes	15

6. Bestimmung der Enzymaktivitäten	17
6.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphatase	17
6.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Aminopyrindemethylase	20
6.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glucuronyltransferase	24
6.4. In-vitro-Versuch	28
C Statistische Auswertung	29
D Ergebnisse	30
1. Langzeitversuche	30
2. Kurzzeitversuche	31
3. Versuche zur Klärung des Induktionsmechanismus	32
4. Versuche zur Klärung eines möglichen Antagonismus von Spironolacton und Aldosteron	33
E Diskussion	39
F Literaturverzeichnis	44

ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Untersuchungen, die zeigten, daß Spironolacton neben der bekannten Wirkung als Aldosteronantagonist Arzneimittel abbauende Enzyme der Lebermikrosomen induziert, waren für uns Anlaß, dieser Spironolactonwirkung intensiver nachzugehen.

Die vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen sollten durch direkte Enzymmessung den Induktionseffekt von Spironolacton auf Enzyme des mischfunktionellen Oxygenierungssystems und auf weitere mikrosomale Enzyme prüfen. Weiterhin war von Interesse, ob Aldosteron enzyminduzierende Eigenschaften besitzt und ob es die Enzyminduktion von Spironolacton antagonistisch verhindern kann. Ferner sollte die Wirkung anderer Diuretika wie Etacrynsäure und Furosemid auf mikrosomale Enzyme geprüft werden.

Als Versuchstiere dienten männliche SIV-Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 80 bis 100 g. Die Behandlung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion. Als Parameter dienten das absolute und relative Leberfeuchtgewicht, der Mikrosomenproteingehalt pro Gramm Leber sowie die spezifische Aktivität der Enzyme Aminopyrindemethylase, Glucuronyltransferase und Glucose-6-phosphatase.

Achttägige Behandlung mit einer Tagesdosis von 20 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht bewirkte einen Aktivitätsanstieg der Aminopyrindemethylase um 70 % und der Glucuronyltransferase um 64 %; die Aktivität von Glucose-6-phosphatase sowie alle weiteren oben genannten Parameter zeigten keine Veränderung im Vergleich zu Kontrolltieren. Bereits 24 Stunden nach Verabreichung von 2 x 10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht trat eine maximale Stimulierung der Aminopyrindemethylierung ein, die 72 Stunden nach der letzten Injektion wieder zur Norm absank. Ein initialer Hemmeffekt der Aminopyrindemethylaseaktivität trat nicht ein. Durch 24stündige Behandlung mit einer Gesamtdosis von 20 mg Spironolacton und 0,15 mg Actinomycin-D pro 100 Gramm Körpergewicht konnte die Induktion des Enzyms Aminopyrindemethylase völlig unterbunden werden, während Hemmversuche mit den Substanzen Cycloheximid, Sanamycin und

Äthionin zu keinem aussagekräftigen Ergebnis führten. Aldosteronbehandlung bis zu acht Tagen mit einer Tagesdosis von 0,5 mg pro 100 Gramm Körpergewicht hatte keine Beeinflussung der untersuchten Parameter zur Folge. Ein antagonistischer Effekt von Aldosteron zu Spironolacton in Bezug auf die Induktion des Enzyms Aminopyrindemethylase war nicht festzustellen. Achttägige Etacrynsäurebehandlung mit einer Tagesdosis von 0,3 mg pro 100 Gramm Körpergewicht hatte einen Anstieg der Aminopyrindemethylierung um 41 % zur Folge, während alle anderen oben aufgeführten Parameter keine Veränderung im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten. Acht-tägige Furosemidbehandlung mit einer Tagesdosis von 2 mg pro 100 Gramm Körpergewicht hatte auf keinen der oben genannten Parameter einen Einfluß. Kombinierte Vorbehandlung mit Spironolacton und Etacrynsäure hatte gegenüber der alleinigen Spironolactonbehandlung keine zusätzliche Veränderung der Parameter zur Folge.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß eine Induktion mikrosomaler Enzyme der Rattenleber durch Spironolacton nur bei arzneimittelabbauenden Enzymen stattfindet, nach Absetzen von Spironolacton reversibel ist und auf einer vermehrten Enzymsynthese beruht. Aldosteron besitzt selbst weder enzyminduzierende Eigenschaften noch vermag es antagonistisch die Enzyminduktion durch Spironolacton aufzuheben. Neben Spironolacton vermag Etacrynsäure nur Enzyme des mischfunktionellen Oxygenierungssystems, Furosemid hingegen keines der untersuchten mikrosomalen Enzyme zu induzieren.

EINLEITUNG

Den Enzymen der Mikrosomenfraktion von Leberzellen kommt eine große Bedeutung für den Pharmakastoffwechsel zu. Pharmaka sind häufig lipophile Substanzen, die vom Organismus nur dann ausgeschieden werden können, wenn sie in hydrophile Verbindungen umgewandelt worden sind, denn lipophile Substanzen, die in den lipoidreichen Grenzflächen der Nierentubuli gut löslich sind, diffundieren entsprechend dem Konzentrationsgefälle vom Primärharn in das Kapillarblut zurück (5). Nur Stoffe, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und damit schlechten Lipidlöslichkeit der passiven Rückdiffusion aus dem Primärharn entgehen, können im Harn ausgeschieden werden (5). Die Überführung in hydrophile Substanzen geschieht durch unspezifische Hydrolasen, durch Reduktasen, durch Konjugationsreaktionen sowie oxidative Reaktionen. Die Aktivität Pharmaka metabolisierender Enzyme ist von vielen Faktoren abhängig, wie zum Beispiel der Tierspezies, dem Alter, dem Geschlecht der Tiere und der Jahreszeit (6). Auch eine Vielzahl von Pharmaka beeinflusst die Enzymaktivität, so zum Beispiel Phenobarbital (7).

In letzter Zeit wurde auch bei Spironolacton neben dem bekannten Effekt im Mineralhaushalt als Aldosteronantagonist eine bisher unbekannte Wirkung auf die Leber festgestellt. So wiesen Untersuchungen von HORVATH et al. (3), KOVACS et al. (2), SOLYMOSS et al. (1) und SELYE et al. (4) darauf hin, daß Spironolacton im Tierversuch eine induzierende Wirkung auf Pharmaka metabolisierende Enzyme besitzt, was uns zu den nachfolgenden Untersuchungen veranlaßte.

A EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es wird die Beeinflussung mikrosomaler Enzyme in isolierten Rattenleber-mikrosomen nach Verabreichung der Diuretika Spironolacton, Etacrynsäure und Furosemid sowie von Aldosteron geprüft. Hierfür dienen als Parameter das absolute und auf 100 Gramm Körpergewicht bezogene relative Leberfeuchtgewicht, der Mikrosomenproteingehalt pro Gramm Leber sowie die spezifische Aktivität mikrosomaler Enzyme. Als Vertreter des mischfunktionellen Oxygenierungssystems wird das Enzym Aminopyrindemethylase, als Vertreter der Konjugationsreaktion das Enzym Glucuronyltransferase und als Vertreter eines nicht Arzneimittel abbauenden Enzyms, dessen Aktivität sowohl in glatten als auch rauen Membranen des endoplasmatischen Reticulums nachweisbar ist (8), die Glucose-6-phosphatase gewählt.

1. Langzeitversuche

Nach 6- bis 8tägiger Behandlungszeit mit Spironolacton, Etacrynsäure und Furosemid wird geprüft, welches Diuretikum mikrosomale Enzyme beeinflusst und ob sie spezifisch auf Arzneimittel abbauende mikrosomale Enzyme einwirken. Da Spironolacton auch kombiniert mit Etacrynsäure bzw. Furosemid zur Anwendung kommt, wird auch der Effekt einer kombinierten Verabreichung auf die genannten Parameter geprüft.

2. Kurzzeitversuche

Nach Behandlungszeiten von 4, 6, 12 und 24 Stunden sowie 5 Tagen werden anhand der spezifischen Aktivität des Enzyms Aminopyrindemethylase folgende, für den zeitlichen Induktionsablauf nach Spironolactonbehandlung interessanten Faktoren untersucht:

- a) Das Behandlungsintervall, nach dem ein erster signifikanter Anstieg der spezifischen Aktivität erfolgt.
- b) Das Behandlungsintervall, nach welchem der maximale Anstieg der spezifischen Aktivität erreicht wird.
- c) Die Abklingquote der spezifischen Aktivität nach Beendigung der Behand-

lung, die einen maximalen Anstieg bewirkt hatte.

- d) Tritt zu Beginn der Spironolactonbehandlung ein vorübergehender Hemmeffekt der spezifischen Aktivität auf, da die induzierend wirkende Substanz selbst Substrat des induzierten Enzyms ist?

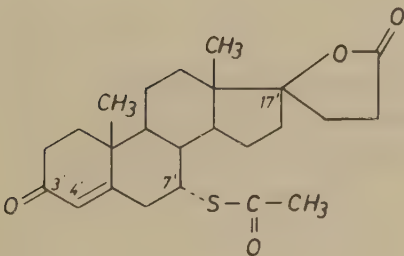
3. Versuche zur Aufklärung des Induktionsmechanismus

Durch Behandlung der Tiere mit einem Hemmstoff der Proteinsynthese zusammen mit Spironolacton wird versucht, die erwartete Enzyminduktion durch Spironolacton zu verhindern. Als Hemmstoff wird Actinomycin D verwendet.

4. Versuche mit Aldosteron

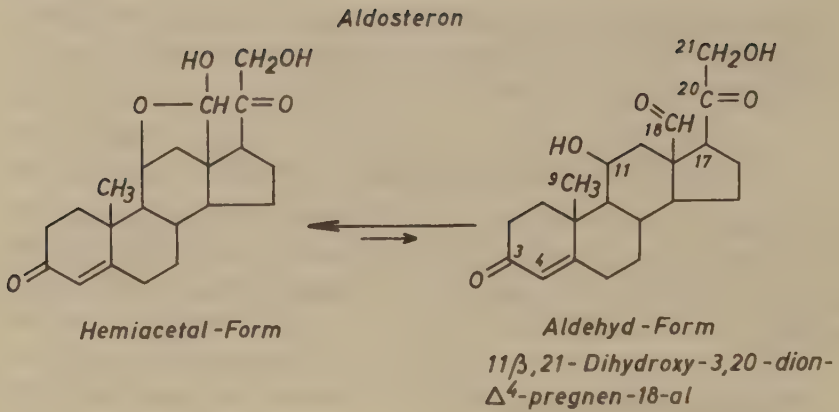
In Versuchen mit Behandlungszeiten von sechs bis acht Tagen wird geprüft, ob der körpereigenen Substanz Aldosteron aufgrund der Strukturähnlichkeit mit Spironolacton (Abbildungen 1 und 2) ein Enzyminduktionseffekt zukommt. Versuche mit gleichzeitiger Aldosteron- und Spironolactonbehandlung über 24 Stunden sollen anhand der spezifischen Aktivität des Enzyms Aminopyrindemethylase klären, ob Aldosteron antagonistisch den Induktionseffekt von Spironolacton verhindern kann.

Abb. 1:



Spironolacton
3-(3'-Oxo-7'- α -acetylthio-17' β -hydroxy- Δ^4 -androsten-17 α -yl)-propionsäurelacton

Abb. 2:



5. In-Vitro-Versuch

Durch einen vorausgehenden orientierenden in-vitro-Versuch soll geprüft werden, ob nach Zusatz von Spironolacton, Etacrynsäure, Furosemid und Aldosteron zu dem Bestimmungsansatz der Aminopyrindemethylase ein verminderter Abbau des verwendeten Substrats Aminopyrin auftritt.

B VORBEHANDLUNG UND METHODEN

1. Versuchstiere

Es wurden männliche SIV-Ratten (Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allg.) verwendet mit einem Ausgangsgewicht von 80 - 100 Gramm, die Altromin-Standarddiät und Wasser erhielten.

2. Vorbehandlung der Tiere

Die Verabreichung aller Substanzen erfolgte durch intraperitoneale Injektion.

2.1. Vorbehandlung mit Spironolacton ¹⁾ (Aldactone pro injectione ^R, Fa. Boehringer, Mannheim)

10 mg wurden in 1 ml Aq. dest. gelöst.

- a) Tiere, die 2, 4, 6 oder 12 Stunden vor dem Töten eine einmalige Dosis von 10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht erhielten.
- b) Behandlung während 24 Stunden mit einer Gesamtdosis von 20 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; die Tiere wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion getötet.

1) Das verwendete Präparat Aldactone pro injectione ^R enthält Aldadiene-Kalium. Diese Substanz hat die gleiche Wirkung wie Spironolacton. Im folgenden wird die bekanntere Bezeichnung Spironolacton verwendet.

- c) Tiere, die bei einer Gesamtdosis von 10 mg, 20 mg und 100 mg pro 100 Gramm Körpergewicht jeweils 12 und 24 Stunden sowie 5 Tage nach Beginn der Spironolactonbehandlung getötet wurden. ¹⁾
- d) Behandlung während 8 Tagen mit einer Tagesdosis von 20 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; die Tiere wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion getötet.

2.2. Vorbehandlung mit Actinomycin D (Fa. Serva, Heidelberg)

0,04 mg wurden in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst.

Tiere, die während 24 Stunden eine Gesamtdosis von 0,15 mg pro 100 Gramm Körpergewicht erhielten; Einzeldosis 0,05 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; die Tiere wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion getötet.

2.3. Vorbehandlung mit Actinomycin D und Spironolacton

Behandlung wie unter 2.1. b) und 2.2. angegeben; die Spironolactoninjektion erfolgte jeweils 1 Stunde nach der Actinomycin D-Injektion.

2.4. Vorbehandlung mit Etacrynsäure (Hydromedin ^R, Fa. Sharp und Dohme, München)

1 mg wurde in 3 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst.

- a) Behandlung während 8 Tagen mit einer Tagesdosis von 0,3 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 0,15 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; 14 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet.

1) Einzeldosis wie unter 2.1. d)

- b) Behandlung während 8 Tagen mit einer Tagesdosis von 0,8 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 0,4 mg pro 100 Gramm Körpergewicht.

2.5. Kombinierte Behandlung mit Etacrynsäure und Spironolacton

Behandlung wie unter 2.1. d) und 2.4. b) angegeben; die beiden Substanzen wurden zur gleichen Zeit injiziert.

2.6. Vorbehandlung mit Furosemid
(Lasix^R, Farbwerke Hoechst)

10 mg pro ml Lösung.

Behandlung während 8 Tagen mit einer Tagesdosis von 2 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 1 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; die Tiere wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion getötet.

2.7. Kombinierte Behandlung mit Furosemid und Spironolacton

Kombinierte Behandlung wie unter 2.1. d) und 2.5. angegeben; die beiden Substanzen wurden gleichzeitig verabreicht.

2.8. Vorbehandlung mit Aldosteron
(Aldocorten^R, Ciba AG, Wehr/Baden)

0,5 mg Aldosteron wurden in 1 ml Aq. dest. gelöst.

- a) Behandlung während 6 Tagen mit einer Tagesdosis von 0,5 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; Einzeldosis 0,25 mg pro 100 Gramm Körpergewicht; die Tiere wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion getötet.
- b) Behandlung während 8 Tagen mit der gleichen Dosis wie unter a) angegeben.

- c) Behandlung während 24 Stunden mit einer Gesamtdosis von 0,5 mg pro 100 Gramm Körpergewicht.
- d) Vorbehandlung mit Aldosteron und Spironolacton; Dosierung wie oben unter c) und 2.1. b) angegeben; die Spironolactoninjektion erfolgte 1 Stunde nach der Aldosteronbehandlung.

2.9. Vorbehandlung der Kontrolltiere

Vorbehandlung mit jeweils volumenäquivalenten Mengen von 0,9 %iger NaCl-Lösung.

3. Töten und Verarbeitung der Tiere

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Tiere 14 Stunden nach der letzten Injektion durch Äthernarkose betäubt und danach durch beidseitige Eröffnung der Carotiden entblutet. Die Leber wurde freipräpariert, vollständig entnommen und nach Feststellung des Leberfeuchtgewichts in eisgekühlten Gefäßen aufbewahrt.

4. Homogenisierung und Zellfraktionierung

Die Mikrosomenpräparation erfolgte nach dem von SCHNEIDER (9) beschriebenen Verfahren.

Alle Präparationsschritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt. Die Pufferlösungen wurden im Kühlschrank bei $0^{\circ} - 4^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt, alle Gefäße in Eiswasser vorgekühlt. Die Leber wurde im Verhältnis 1 Gramm Leber zu 3 ml Tris-HCl-puffer 0,02 Mol/l, pH 7,4, mit 0,25 Mol/l Saccharose aufgenommen und in einem Homogenisator nach POTTER und ELVEHJEM (10) 3 x 20 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde in der Servall-Zentrifuge RC2 im Rotor SS-34 20 Minuten bei $0^{\circ} - 4^{\circ} \text{C}$ mit 10 000 R.p.M.

($\approx 12\,100\,g_{\text{max}}$) zentrifugiert. Der Niederschlag (Zelldedritus, Zellkerne, Mitochondrien, Lysosomen) wurde verworfen. Der Überstand wurde in der Spinco-Zentrifuge Modell L im Rotor 30 im Vakuum bei 4°C und mit 30 000 R.p.M. ($\approx 105\,000\,g_{\text{max}}$) 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Spinco-Zentrifugation (Cytoplasma) wurde verworfen, der Niederschlag stellt die Mikrosomenfraktion dar.

Die Mikrosomenfraktion wurde in Tris-HCl-puffer 0,1 Mol/l, pH 7,4, im Verhältnis 3:1 (Leberfeuchtgewicht : Volumen) aufgenommen und im Homogenisator 1 x 20 Sekunden homogenisiert.

5. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomensuspension erfolgte mit Biuret-Reagenz nach BEISENHERZ et al. (11).

Die störende unspezifische Trübung wurde in Anlehnung an BODE et al. (12) durch KCN-Zusatz erfaßt.

Biuret-Reagenz wurde aus der Apotheke der Universitätskliniken Gießen,

K-Cyanid von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Das Biuret-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen:

9 g Kalium-Natrium-Tartrat wurden in 400 ml carbonatfreier 0,2 Mol/l NaOH vollständig gelöst und 3 g pulverisiertes $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Nach Auflösung wurden 5 g KJ zugegeben, ebenfalls vollständig gelöst und mit 0,2 Mol/l NaOH auf 1 000 ml aufgefüllt.

Die KCN-Lösung enthielt 15 g in 100 ml Aq. dest.

Von der Mikrosomensuspension wurden 0,05 ml bzw. 0,1 ml eingesetzt, mit Aq. dest. auf 0,85 ml aufgefüllt und mit 0,15 ml Trichloressigsäure (3 Mol/l) gefällt. Der Niederschlag wurde auf einer Tischzentrifuge 1 Minute bei 1 500 R.p.M. abzentrifugiert, der wasserklare Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen.

Der Niederschlag wurde in 5 ml Biuret-Reagenz durch "Plümpern" aufgelöst, mit 5 ml Aq. dest. aufgefüllt und 30 Minuten im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 4,8 ml abgehebert und ihnen 0,2 ml KCN-Lösung zugesetzt. Der Rest wurde zur Extinktionsmessung aufbewahrt. Den gleichen Bestimmungsschritten unterlag ein Leerwert, der sich aus 5 ml Biuret-Reagenz und 5 ml Aq. dest. zusammensetzte. Es wurde jeweils mit Doppelwerten gearbeitet.

Die Extinktionen wurden in 10 mm-Glasküvetten bei einer Wellenlänge von 546 nm im Beckman-grating-spectro-Photometer gegen einen Blindwert mit Aq. dest. gemessen. Im KCN-Ansatz war der blaue Protein-Biuret-Komplex durch Cyanid-Zusatz vollständig entfärbt worden. Die Extinktion des KCN-Ansatzes entspricht nach BODE (12) einer unspezifischen Lipidtrübung, die mit dieser Reaktion erfasst und eliminiert werden konnte.

Der Proteingehalt wurde wie folgt berechnet:

Proteingehalt im eingesetzten Volumen =

$$f \cdot (E_1M - E_2M) - (E_1L - E_2L)$$

f = Biuretfaktor = $19,5 \times 2$ (nach BEISENHERZ (11))

E_1M = Extinktion des blauen Biuretansatzes

E_2M = Extinktion des mit KCN entfärbten Biuretansatzes

E_1L = Extinktion des blauen Leerwert-Biuretansatzes

E_2L = Extinktion des mit KCN entfärbten Leerwert-Biuretansatzes

Die endgültige Angabe des Proteingehaltes erfolgte in mg pro 1 ml Mikrosomensuspension.

6. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Bis zum Ablauf der Bestimmungsreaktion wurden alle Lösungen in Eis aufbewahrt.

6.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphatase, nach JAKOBSSON (13)

Die Bestimmung beruht auf der quantitativen Erfassung von freigesetztem anorganischem Phosphat.

Lösungen:

1. Puffer: Tris-maleat, 0,1 Mol/l, pH 6,6.
(Die Substanz wurde als Di-Natriumsalz von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen)
2. Substrat: Glukose-6-phosphat, 0,2 Mol/l
(Die Substanz wurde als Di-Natriumsalz von der Firma E. Boehringer, Mannheim, bezogen)
3. Mikrosomensuspension: 2,5 mg Protein/ml
(Diese Konzentration wurde mit Lösung 1. eingestellt)
4. Fällungsmittel: 10 %ige Tri-chloressigsäure
(Fa. Merck, Darmstadt)
5. Eichlösung: 50 µg Phosphat/ml
(Phosphor-Biochemica-test-combination der Fa. Boehringer, Mannheim)
6. Lösungen zur Phosphat-Bestimmung:
Ammoniumvanadat-Lösung 0,021 Mol/l
Ammoniummolybdat-Lösung 0,04 Mol/l
(Phosphor-Biochemica-test-combination der Fa. Boehringer, Mannheim)

Für den Reaktionsansatz wurden eingesetzt:

0,3 ml Puffer (Endkonzentration im Ansatz: 0,06 Mol/l), 0,1 ml Substratlösung (Endkonzentration im Ansatz: 0,04 Mol/l).

Der Ansatz sowie die Mikrosomensuspension wurden 3 Minuten im Wasserbad bei 37° C vorinkubiert, danach 0,1 ml Mikrosomensuspension (Endkonzentration im Ansatz: 0,5 mg Protein pro 1 ml) zugegeben.

Die Reaktion lief im Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von 37° C ab, unter ständigem Schütteln durch eine Schüttelmaschine. Sie wurde nach 5 Minuten mit Trichloressigsäure gestoppt. Das ausgeflockte Protein wurde innerhalb von 10 Minuten bei 3 000 R.p.M. in der Martin-Christ-Zentrifuge (Osterode/Harz), Typ UJ3S, abzentrifugiert. Von dem wasserklaren Überstand wurde 1 ml abgehebert und mit 1 ml Molybdat und 1 ml Vanadat gemischt. Die Extinktion der gelben Lösung wurde in 10 mm-Glasküvetten bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen einen Blindwert von Aq. dest. im Beckman-grating-spectro-Photometer gemessen.

Den gleichen Bestimmungsschritten unterlag

ein Eichwert, der anstelle des Substrates und Puffers 0,4 ml Eichlösung enthielt,

ein Leerwert, der anstelle des Substrates 0,1 ml Puffer enthielt.

Es wurde jeweils mit Doppelwerten gearbeitet.

Die spezifische Aktivität wurde wie folgt berechnet:

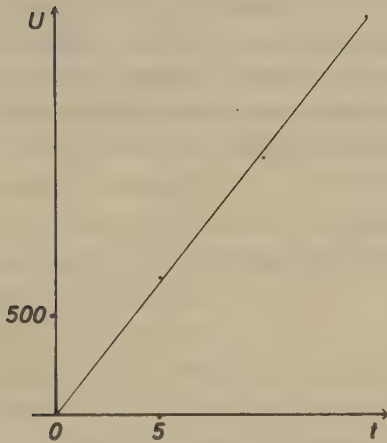
Die Molanzahl des freigesetzten anorganischen Phosphats ist stöchiometrisch gleich dem Umsatz des Substrats Glukose-6-phosphat.

$$\frac{A \cdot (E_A - E_{LW})}{B \cdot C \cdot (E_{EW} - E_{LW})} = \text{Umsatz an Glukose-6-phosphat in nMol pro 1 Minute und 1 mg Protein}$$

- E_A = Extinktion des Reaktionsansatzes
- E_{LW} = Extinktion des Reaktionsleerwertansatzes
- E_{EW} = Extinktion des Reaktionseichwertansatzes
- A = Menge des Phosphats im Eichwert in nMol
- B = Reaktionszeit in Minuten
- C = Proteinmenge im Reaktionsansatz in mg

Der Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve (Abb. 3) läßt erkennen, daß die angewandte Reaktionszeit im linearen Bereich liegt.

Abb. 3:

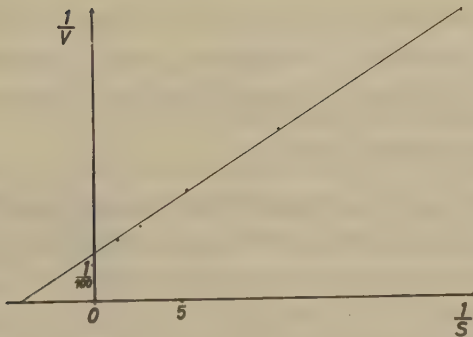


Zeit - Umsatz Diagramm: Glucose-6-phosphatase

U = Umsatz von Glucose-6-phosphat in nMol pro mg Protein

t = Reaktionszeit in Min.

Abb. 4:



Lineweaver-Burk Diagramm: Glucose-6-phosphatase

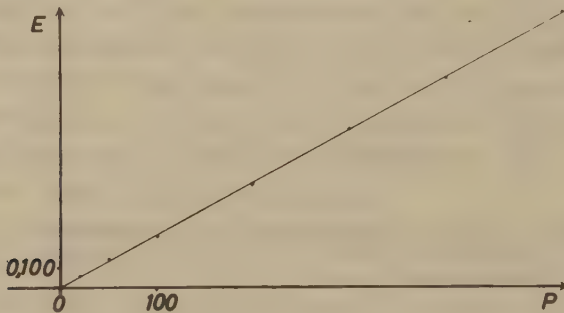
Michaelis-Menten-Konstante = $0,24 \times 10^{-3}$ Mol/l

V = Umsatz von Glucose-6-phosphat in nMol pro mg Protein und pro Min.

S = Substratkonzentration in mMol/l

Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt $0,24 \text{ mMol/l}$ (Abb. 4). Bei der verwendeten Substratkonzentration von 40 mMol/l beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit 99% der Maximalgeschwindigkeit. Die Eichkurve (Abb. 5) zeigt im Bereich der verwendeten Phosphatkonzentrationen einen linearen Verlauf. Es besteht eine direkte Proportionalität von Phosphatkonzentration und Extinktion.

Abb. 5:



Eichkurve: Phosphat
E = Extinktion
P = Phosphat in nMol pro ml

6.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Aminopyrin-demethylase

Die Bestimmung beruht auf der quantitativen Erfassung des bei der oxidativen Demethylierung von Aminopyrin entstehenden Reaktionsproduktes Formaldehyd nach NASH (14).

Lösungen:

1. Puffer: Sörensen Phosphat-Puffer, $0,15 \text{ Mol/l}$, pH 7,4
(Festsubstanzen von Fa. Merck, Darmstadt)
2. Substrat: Aminopyrin, $45 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$, in Lösung 1. gelöst
(Fa. Merck, Darmstadt)

3. NADPH-regenerierendes System: (Konzentrationsgabe hier im Endansatz von 1,5 ml):
NADP⁺ Di-Na-Salz, $0,5 \times 10^{-3}$ Mol/l (Fa. Boehringer, Mannheim),
Isocitrat Tri-Na-Salz, 5×10^{-3} Mol/l (Fa. Schuchardt, München),
Isocitrat-dehydrogenase 0,003 ml (20 mg Protein pro 2 ml Lösung)
(Fa. Schuchardt, München),
MgCl₂, 4×10^{-3} Mol/l (Fa. Merck, Darmstadt)
4. Mikrosomensuspension : 6 mg Protein / 1 ml (diese Konzentration wurde mit Lösung 1. hergestellt)
5. Eichlösung: 10^{-3} Mol/l HCHO
6. Fällungsmittel: Trichloressigsäure, 20 %ig
7. Nash-Reagenz: 15 g Ammoniumacetat wurden mit 0,2 ml Acetylaceton gemischt, mit Eisessig auf pH 6,0 eingestellt und mit Aq. dest. auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche mit Silberpapier umhüllt im Kühlschrank aufbewahrt; das Reagenz wurde nach maximal 3 Tagen neu hergestellt.

Der Reaktionsansatz enthielt:

0,5 ml Substratlösung - Endkonzentration im Ansatz 15×10^{-3} Mol/l
0,5 ml Regenerierendes System;

Der Reaktionsleerwert enthielt anstelle des Substrats 0,5 ml Puffer und wurde mitbestimmt, weil Mikrosomen zusammen mit NADPH-regenerierendem System Formaldehyd entstehen lassen (LEBER, persönliche Mitteilung).

Das NADPH-regenerierende System wurde kurz vor Beginn der Vorinkubation des Ansatzes und der Mikrosomensuspension (im Wasserbad für 3 Minuten bei 37° C) hergestellt.

Nach Zugabe von 0,5 ml Mikrosomensuspension zum Reaktionsansatz lief die Reaktion bei konstanter Temperatur von 37° C im Wasserbad und bei gleichmäßigem Schütteln mit Hilfe einer Schüttelapparatur ab. Nach genau 5 Minuten wurde die Reaktion mit 0,5 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Das ausfallende Eiweiß wurde in der Martin-Christ-Zentrifuge (Osterode/Harz), Typ UJ3S, während 10 Minuten bei 3 000 R.p.M. abzentrifugiert; 1,2 ml des wasserklaren Überstandes wurden abgehebert, mit

1,2 ml Nash-Reagenz gemischt, gut geschüttelt und für 8 Minuten im Wasserbad bei 58⁰ C inkubiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde die Extinktion der gelben Lösung im Beckman-grating-spectro-Photometer in 10 mm-Glasküvetten bei einer Wellenlänge von 412 nm gegen einen Blindwert von Aq. dest. gemessen.

Den gleichen Bestimmungsschritten unterlag:

ein Eichwert, der anstelle des NADPH-regenerierenden Systems 0,4 ml Puffer und 0,1 ml Eichlösung (entsprechend 100 nMol HCHO im Endansatz von 1,5 ml) enthielt.

Es wurde jeweils mit Doppelwerten gearbeitet.

Berechnung der spezifischen Aktivität:

$$\frac{A (E_A - E_{A, LW})}{B C E_{EW}} = \text{gebildete Menge HCHO in nMol pro 1 mg Protein und pro 1 Minute}$$

E_A = Extinktion des Reaktionsansatzes

$E_{A, LW}$ = Extinktion des Reaktionsleerwertes

E_{EW} = Extinktion des Eichwertes

A = Menge an HCHO im Reaktionseichwert (100 nMol)

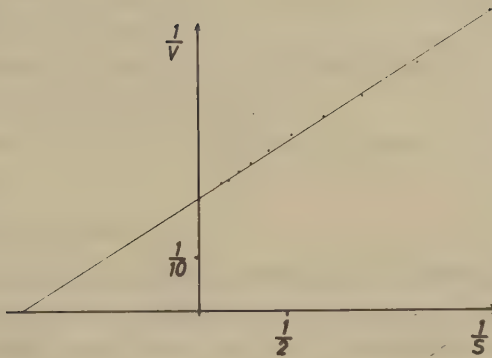
B = Reaktionszeit (5 Minuten)

C = Proteinkonzentration im Ansatz (3 mg im Ansatz von 1,5 ml)

Die spezifische Aktivität wurde in nMol Umsatz pro 1 mg Protein und pro 1 Minute angegeben.

Die Michaelis-Menten-Konstante wurde aus Bestimmungen von 3 Tieren ermittelt; sie beträgt 1 mMol/l (Abb. 6). Bei der verwendeten Substratkonzentration von 15 mMol/l beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit 94% der Maximalgeschwindigkeit. Die Zeit-Umsatz-Kurve zeigt, daß bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten der Umsatz im linearen Bereich liegt (Abb. 7). Eichkurve siehe Abb. 8.

Abb. 6:



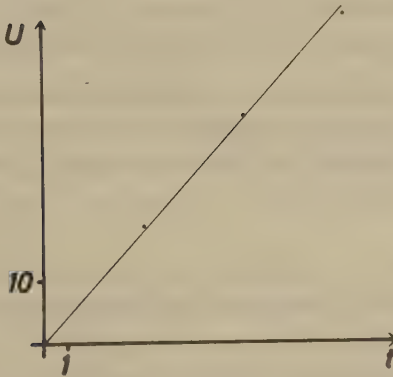
Lineweaver-Burk Diagram: Aminopyrindemethylase

Michaelis-Menten-Konstante = 1,0 mMol/l

V = Umsatz von Aminopyrin in nMol pro mg Protein und pro Min.

S = Substratkonzentration in mMol /l

Abb. 7:

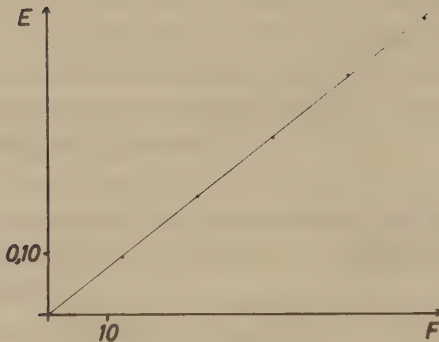


Zeit - Umsatz Diagramm: Aminopyrindemethylase

U = Umsatz von Aminopyrin nMol pro mg Protein

t = Reaktionszeit in Min.

Abb. 8:



Eichkurve: Formaldehyd

E = Extinktion

F = Formaldehyd in nMol pro ml

6.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität der
Glucuronyltransferase (in Anlehnung an PERONA (15))

Die Bestimmung beruht auf der Messung der Fluoreszenzabnahme von 4-methyl-umbelliferon. Dieses Substrat verliert seine Fluoreszenz durch Kopplung an Glucuronsäure, welche durch das Enzym Glucuronyltransferase katalysiert wird.

Lösungen:

1. Puffer: Tris-HCl-Puffer, 0,15 Mol/l, pH 7,5 (Festsubstanz von Fa. Merck, Darmstadt)
2. Aktivatoren: MgCl_2 , 0,3 Mol/l (Fa. Merck, Darmstadt); KCl, 0,154 Mol/l (Fa. Merck, Darmstadt); beide Aktivatoren wurden in Aq. dest. gelöst.
3. Cosubstrat: aktive Glucuronsäure = UDPGA, 8×10^{-3} Mol/l in Puffer (1.) gelöst (Fa. Boehringer, Mannheim)
4. Substrat: 4-methyl-umbelliferon, 10^{-3} Mol/l (Fa. Schuchardt, München)

5. Mikrosomensuspension: 15 mg Protein pro ml; diese Konzentration wurde mit Lösung 1. hergestellt.
6. Fällungsmittel: ein Gemisch aus 0,66 Mol/l H_2SO_4 und 10%iger Na-wolframat-Lösung und Aq. dest. zu gleichen Teilen.
7. Glycin-Puffer: 0,1 Mol/l, pH 11,0, zur Aufnahme des Rest-4-methyl-umbelliferon.

Der Reaktionsansatz enthielt:

0,2 ml Tris-Puffer; 0,04 ml MgCl_2 -Lösung; 0,1 ml KCl-Lösung; 0,2 ml UDPGA-Lösung mit einer Endkonzentration im Ansatz von $1,6 \times 10^{-3}$ Mol/l; 0,36 ml 4-methyl-umbelliferon-Lösung mit einer Endkonzentration im Ansatz von $3,6 \times 10^{-4}$ Mol/l.

Die Ansätze, jeweils mit Doppelwert, sowie die Mikrosomensuspension wurden im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C getrennt 3 Minuten lang vorinkubiert.

Die Ansätze wurden durch Zugabe von 0,1 ml Mikrosomensuspension gestartet. (Endkonzentration im Ansatz 1,5 mg Protein pro 1 ml.) Nach 0 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten Inkubation bei 37°C und ständigem Schütteln wurden jeweils 0,1 ml entnommen und in ein vorpipettiertes Fällungsmittel gegeben, welches 0,2 ml H_2SO_4 -Lösung, 0,2 ml Na-wolframat-Lösung und 1,5 ml Aq. dest. enthielt. Der Niederschlag wurde 10 Minuten bei 3 000 R.p.M. in der Martin-Christ-Zentrifuge (Osterode/Harz), Typ UJ3S, abzentrifugiert, vom Überstand 0,5 ml abgehebert und in 3 ml Glycin-Puffer aufgenommen.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in 10 mm-Quarzküvetten bei einer anregenden Wellenlänge von 374 nm (corning filter No. 5860) und einem Außenfilter mit 445 nm (corning filter No. 3389) im Beckmann-Fluorometer.

Berechnung der spezifischen Aktivität:

Der 0-Minuten-Wert ist gleich einer Transmittance von 100. F_X ist gleich der Transmittance nach X Minuten. Die Differenz $100 - F_X$ entspricht in Prozent der Menge an konjugiertem 4-methyl-umbelliferon.

Im Ansatz sind 360 nMol 4-methyl-umbelliferon enthalten.

Daraus ergibt sich die Gleichung $360 : 100 = x : (100 - F_X)$, wobei x die Menge konjugierten 4-methyl-umbelliferons nach X Minuten ist; $x = (100 - F_X) 3,6$; die Menge konjugierten 4-methyl-umbelliferons in 1 Minute ist folglich

$$(100 - F_X) \frac{3,6}{X \text{ min.}}$$

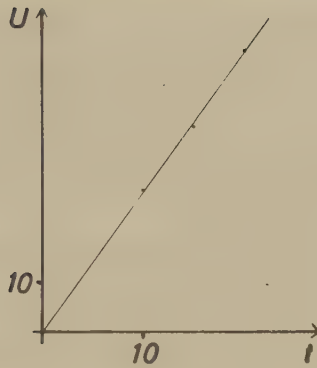
Die Proteinkonzentration betrug 1,5 mg im Ansatz; letztlich ergibt sich zur Berechnung der spezifischen Aktivität, die in nMol konjugiertem 4-methyl-umbelliferon pro 1 Minute und pro 1 mg Protein angegeben würde, folgende Formel:

$$\frac{(100 - F_X) 3,6}{X \text{ min.} \quad 1,5}$$

Die Zeit-Umsatz-Kurve zeigt einen linearen Verlauf im angewandten zeitlichen Meßbereich (Abb. 9); die Bestimmung wurde somit im Sättigungsbe-
reich durchgeführt.

Eichkurve siehe Abb. 10.

Abb. 9:

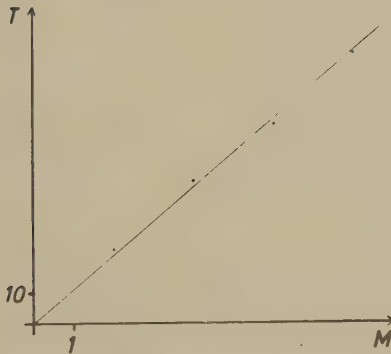


Zeit - Umsatz Diagramm: Glucuronyl-transferase

U = Umsatz von 4-Methylumbelliferon in nMol pro mg Protein

t = Reaktionszeit in Min.

Abb. 10:



Eichkurve: 4-Methylumbelliferon

T = Transmission in %

M = 4-Methylumbelliferon in nMol pro ml

6.4. In-vitro-Versuch

Der in-vitro-Versuch prüft die Änderung der spezifischen Aktivität der Aminopyrindemethylase in Anwesenheit von Aldosteron, Furosemid, Spiro-
nolacton und Etacrynsäure im Bestimmungsansatz.

Die oben genannten Substanzen wurden in Phosphat-Puffer (nach Sörensen) 0,15 Mol/l, pH 7,4, gelöst und lagen im Endansatz in der gleichen Konzen-
tration vor wie das Substrat Aminopyrin.

Die Bestimmung wurde nach der gleichen Methode wie die der Aktivitätsbe-
stimmung der Aminopyrindemethylase durchgeführt, bis auf folgende Un-
terschiede:

Der Ansatz enthielt anstelle von 0,5 ml NADPH-regenierendes System
0,2 ml mit einer entsprechend höheren Konzentration, so daß das NADPH-
regenerierende System im Ansatz in gleicher Endkonzentration vorlag.
Dafür wurde im Reaktionsansatz sowie im Reaktionsleerwert 0,3 ml einer
der oben angegebenen Lösungen eingesetzt.

Gleichzeitig wurde ein Ansatz durchgeführt, welcher keine der oben aufge-
führten Lösungen enthielt, dafür jedoch die entsprechende Menge an Puf-
fer.

Die Kontrolle der pH-Werte in den jeweiligen Ansätzen ergab Werte von
 $7,4 \pm 0,1$; diese lagen somit in einem für den optimalen Reaktionsablauf
erforderlichen Bereich.

C STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die statistische Auswertung wurde der X-Test angewendet (16). Neben den Mittelwerten sind in den Tabellen als Ausdruck der Streuung die Standardabweichungen angegeben. Signifikante Differenz = Irrtumswahrscheinlichkeit bei einseitiger Anwendung des Tests liegt bei 1 % und darunter (16).

D ERGEBNISSE

1. Langzeitversuche

Wie aus Vorversuchen hervorgeht, beeinflusst die Äthernarkose, die vor der Entblutung der Tiere durchgeführt wurde, die untersuchten Parameter nicht.

Die Untersuchung der Tiere, die während 6 - 8 Tagen mit Spironolacton, Furosemid, Etacrynsäure sowie kombiniert mit Spironolacton und Etacrynsäure bzw. Furosemid behandelt wurden, ergibt folgendes Ergebnis:

Mit Spironolacton, Furosemid und Etacrynsäure während 8 Tagen vorbehandelte Tiere zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede im Verhalten des Körpergewichtes, im absoluten und relativen Leberfeuchtgewicht sowie in der Ausbeute an Mikrosomenprotein pro Gramm Leber (Tab. 1). Die Enzymaktivitäten dieser Tiere zeigen im Vergleich mit den Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der spezifischen Aktivität des Enzyms Aminopyrindemethylase nach Spironolactonvorbehandlung um 70 %, nach Etacrynsäurevorbehandlung um 41 %, jedoch keine Zunahme nach Furosemidvorbehandlung (Tab. 2). Auch eine 2,7mal höhere Dosierung der Etacrynsäure hat keinen weiteren Aktivitätsanstieg des Enzyms Aminopyrindemethylase zur Folge. Die spezifische Aktivität des Enzyms Glucuronyltransferase zeigt im Vergleich mit den Kontrolltieren nur nach Spironolactonvorbehandlung einen signifikanten Anstieg um 63 % (Tab. 2). Sowohl Etacrynsäure- als auch Furosemidvorbehandlung haben keinen signifikanten Aktivitätsanstieg des Enzyms Glucuronyltransferase zur Folge. Die spezifische Aktivität des Enzyms Glucose-6-phosphatase zeigt weder nach Spironolactonvorbehandlung noch nach Etacrynsäure- bzw. Furosemid-Vorbehandlung einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren (Tab. 2).

Die kombinierte Vorbehandlung mit Spironolacton und Etacrynsäure bzw. Spironolacton und Furosemid während 8 Tagen bewirkt im Vergleich zu den allein mit Spironolacton vorbehandelten Tieren weder Unterschiede im Verhalten des Körpergewichtes nach dem Töten, des absoluten und relativen Leberfeuchtgewichts und der Ausbeute an Mikrosomen pro 1 Gramm Leber, noch Unterschiede bei den Parametern Aminopyrindemethylase,

Glucuronyltransferase und Glucose-6-phosphatase.

Die Untersuchung der Tiere, die über 6 und 8 Tage mit Aldosteron behandelt wurden, ergibt im Vergleich zu den Kontrolltieren keinerlei Unterschiede im Verhalten des Körpergewichts nach dem Töten, des absoluten und relativen Leberfeuchtgewichts, des Proteingehalts pro Gramm Leber und des untersuchten Enzymparameters Aminopyrindemethylase.

2. Kurzzeitversuche

Die Langzeitversuche haben gezeigt, daß Spironolacton den weitaus stärksten Induktionseffekt der untersuchten Substanzen aufweist. Daher wurden mit Spironolacton weitere Versuche durchgeführt, die Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der Induktionswirkung geben sollten. Da die spezifische Aktivität der Aminopyrindemethylase den stärksten Induktionseffekt aufwies, wurde dieses Enzym als Parameter der folgenden Versuche herangezogen. Wie bei den Langzeitversuchen zeigt auch eine Spironolactonvorbehandlung von 24 Stunden und 5 Tagen im Vergleich mit den Kontrolltieren keinen Unterschied im Verhalten des Körpergewichts, des absoluten und relativen Leberfeuchtgewichts und der Ausbeute an Mikrosomenprotein pro Gramm Leber (Tab. 3). Die Unterschiede in den Absolutwerten im Vergleich zu den Langzeitversuchen sind auf den zeitlichen Abstand zwischen den beiden Versuchsgruppen - Langzeitversuche, Kurzzeitversuche - und die unterschiedlichen Kollektive zurückzuführen. Da jedoch innerhalb der Kurzzeitversuchsgruppen dieselben relativen Beziehungen bestehen wie bei den Langzeitversuchsgruppen, wird dies vernachlässigt werden können. Eine maximale Stimulierung der Aminopyrindemethylierung zeigt sich bereits 24 Stunden nach einer Gesamtdosis von 2×10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht. Spironolacton. Eine Behandlung der Tiere bis zu 5 Tagen zeigt keinen weiteren Effekt; sowohl nach 24 Stunden als auch nach 5 Tagen Behandlungszeit mit einer Tagesdosis von 2×10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht erreicht die Stimulierung einen Wert, der in beiden Fällen um etwa 62 % im Vergleich zu den Kontrolltieren zugenommen hat (Abb. 11). Bereits 12 Stunden nach einer einmaligen Gabe von 10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht zeigt sich ein signifikanter Anstieg der

Aminopyrindemethylaseaktivität um 37 % (Abb. 11). Ob eine höhere Dosierung einen stärkeren Effekt bedingt, konnte nicht untersucht werden, da eine Erhöhung der Einzeldosis über 10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht bei den Ratten tonisch-klonische Krämpfe hervorruft, die bei etwa der Hälfte der Tiere zum Tod führt. Wird die Behandlung, die innerhalb von 24 Stunden eine maximale Induktion bewirkt, abgesetzt, so zeigt sich 36 Stunden und 48 Stunden nach der letzten Injektion noch ein deutlicher Effekt (Abb. 12). 72 Stunden nach der letzten Injektion ist die spezifische Aktivität der Aminopyrindemethylase wieder zur Norm abgesunken (Abb. 12). Noch kürzere Behandlungszeiten von 2, 4 und 6 Stunden Dauer nach einer einmaligen Gabe von 10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht haben weder einen Induktionseffekt noch einen initialen Hemmeffekt auf die Enzymaktivität (Tab. 4).

3. Versuche zur Klärung des Induktionsmechanismus

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante der Aminopyrindemethylierung bei Spironolactonvorbehandlung ergibt im Vergleich mit der Konstanten bei Kontrolltieren keine Änderung; die Aktivitätssteigerung ist allein Folge der Zunahme von $V_{\max}$ (Tab. 5), somit eines erhöhten Enzymgehaltes pro mg Protein.

Für die Hemmversuche der Proteinsynthese mit Actinomycin D wurde diejenige Behandlungszeit mit Spironolacton gewählt, welche die früheste maximale Induktion bewirkte, also 24 Stunden mit einer Dosis von 2×10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht. Die gewählte Actinomycin-D-Dosis von $2 \times 0,075$ mg pro 100 Gramm Körpergewicht beeinflusst allein verabreicht die Enzymaktivität nicht (Tab. 6). Das Körpergewicht nach dem Töten sowie das absolute und relative Leberfeuchtgewicht und Ausbeute an Mikrosomenprotein zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den Normaltieren, jedoch wird eine Induktion des Enzyms Aminopyrindemethylase durch Spironolacton mit Actinomycin D verhindert (Tab. 6).

4. Versuche zur Klärung eines möglichen Antagonismus von
Spironolacton und Aldosteron

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, zeigt die Aminopyrindemethylaseaktivität der mit Spironolacton und Aldosteron kombiniert vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung wie bei alleiniger Vorbehandlung mit Spironolacton. Bei dem ebenfalls untersuchten Enzym Glucose-6-phosphatase besteht zwischen den verschiedenen Kollektiven kein signifikanter Unterschied. Unter der hier gewählten Behandlungsdauer von 24 Stunden, Spironolactondosis von 2×10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht, Aldosterondosis von $2 \times 0,25$ mg pro 100 Gramm Körpergewicht besteht für die untersuchten Parameter keine antagonistische Wirkung der beiden Substanzen in Bezug auf die Enzyminduktion. Alleinige Aldosteronbehandlung zeigt bei den untersuchten Enzymen Glucose-6-phosphatase und Aminopyrindemethylase keinen induzierenden Effekt (Tab. 7).

Tab. 1:

	Vorbehandlung der Tiere mit :			
	Kontrolltiere n=15	Spiro-nolacton n=10	Etacrynsäure n=10	Furosemid n=8
Körpergewicht n.d.Tode (g)	148 ± 15	139 ± 20	152 ± 12	156 ± 14
Leberfeucht - gewicht (g)	7.3 ± 0.8	7.7 ± 0.6	7.9 ± 0.5	8.0 ± 0.6
g Leber pro 100 g KG	4.9 ± 0.6	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.7	5.2 ± 0.6
mg Mikrosomen - protein pro g Leber	9.6 ± 1.3	8.2 ± 0.9	7.9 ± 1.0	9.1 ± 1.0

Verhalten von Körpergewicht nach dem Töten, absolutem und relativem (bezogen auf 100 g KG) Leberfeuchtgewicht sowie Mikrosomenprotein in mg pro g Leber nach acht-tägiger Vorbehandlung mit Spiro-nolacton, Etacrynsäure und Furosemid. n = Anzahl der Tiere. Signifikanz : ($p < 0.01$), keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollen. Dosierung : pro 24h und 100 g KG : Spiro-nolacton 20 mg, Etacrynsäure 0.3 mg, Furosemid 2 mg.

Tab. 2:

	Vorbehandlung der Tiere mit :			
	Kontrolltiere n=15	Spiro-nolacton n=10	Etacrynsäure n=10	Furosemid n=8
Aminopyrin- demethylase	5.4 ± 0.6	9.2 ± 1.0 ^x	7.6 ± 0.8 ^x	6.4 ± 0.7
Glucuronyl- transferase	2.7 ± 0.6	4.4 ± 0.4 ^x	3.2 ± 0.7	2.5 ± 0.8
Glucose-6- phosphatase	120 ± 16	125 ± 15	126 ± 20	127 ± 19

Spezifische Enzymaktivitäten ($\text{nMol} \times \text{mg Prot.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) von Rattenleber - mikrosomen nach achttägiger Vorbehandlung mit Spiro-nolacton, Etacrynsäure und Furosemid. n = Anzahl der Tiere.

Signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) zu den Kontrolltieren sind mit x gekennzeichnet.

Dosierung : pro 24h und 100 g KG : Spiro-nolacton 20 mg, Etacrynsäure 0.3 mg, Furosemid 2 mg.

Tab. 3:

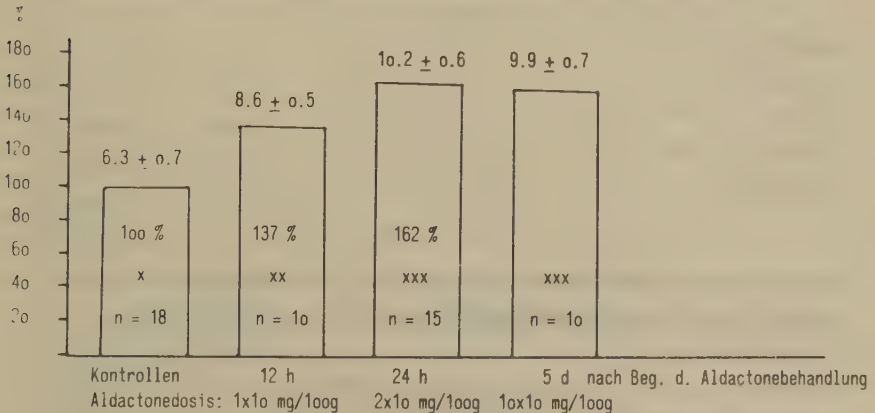
	Kontrolltiere n=18	Dauer der Spironolactongabe :	
		5 Tage n=10	24 h n=15
Körpergewicht n.d.Tode (g)	98 ± 13	118 ± 15	97 ± 12
Leberfeucht - gewicht (g)	5.1 ± 1.0	6.4 ± 0.9	5.6 ± 0.8
g Leber pro 100 g KG	5.2 ± 0.4	5.6 ± 0.6	5.7 ± 0.4
mg Mikrosomen - protein pro g Leber	12.2 ± 2.5	13.8 ± 2.6	12.5 ± 2.4

Verhalten von Körpergewicht nach dem Töten, absolutem und relativem (bezogen auf 100 g KG) Leberfeuchtgewicht sowie Mikrosomenprotein in mg pro g Leber nach Vorbehandlung mit Spironolacton bei einer Tagesdosis von 2×10 mg pro 100 g KG.
n = Anzahl der Tiere.

Signifikanz : ($p < 0.01$), keine signifikanten Unterschiede zu Kontrolltieren.

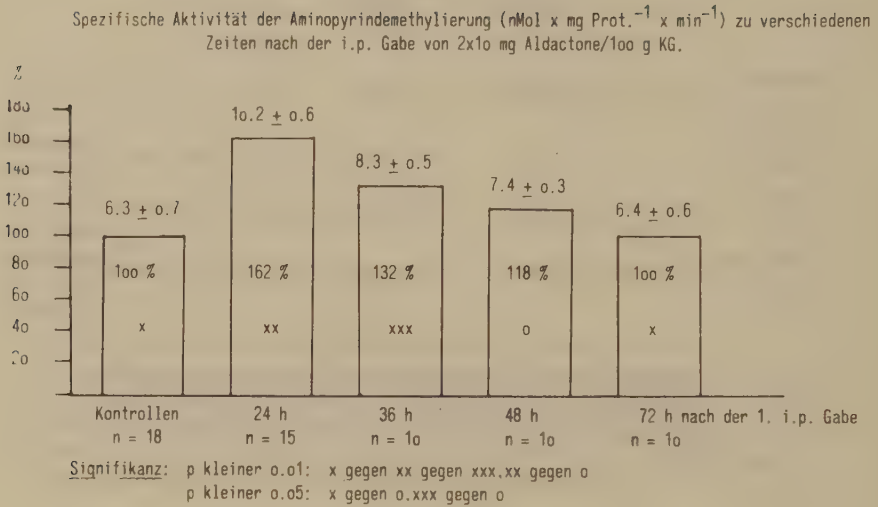
Abb. 11:

Spezifische Aktivität der Aminopyrimidemethylierung ($\text{nMol} \times \text{mg Prot.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) von Rattenlebermikrosomen nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Aldactonedosen.



Signifikanz: p kleiner 0.01: x gegen xx gegen xxx.

Abb. 12:



Tab. 4:

		Spezifische Aktivität Aminopyrindemethylase ($\text{nMol} \times \text{mg Prot.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)
Kontrolltiere	n=18	6.3 ± 0.7
2 h nach Inj.	n=10	6.2 ± 0.8
4 h nach Inj.	n=10	6.0 ± 0.5
6 h nach Inj.	n=10	6.5 ± 0.6
12h nach Inj.	n=10	8.9 ± 0.5^x

Einfluß einer einmaligen Aldactoneinjektion ($10 \text{ mg} / 100 \text{ g Körpergewicht}$) auf die Aminopyrindemethylierung von Rattenlebermikrosomen nach verschiedenen Zeiten.

n = Anzahl der Tiere.

Signifikanz : p < 0.01: x gegen alle Werte der gleichen Spalte.

Dosierung : einmalige Gabe von $10 \text{ mg} / 100 \text{ g KG}$.

Tab. 5:

	Kontrollen n = 5	Spironolacton n = 5
K_M	$1,0 \pm 0,1 \text{ mMol} \times \text{l}^{-1}$	$0,9 \pm 0,12 \text{ mMol} \times \text{l}^{-1}$
$V_{\max}$	$4,9 \pm 0,7 \text{ nMol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$	$9,3 \pm 0,9 \text{ nMol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

K_M und $V_{\max}$ der Aminopyrindemethylierung isolierter Lebermikrosomen von Kontroll -
tieren und Spironolacton vorbehandelten Tieren ($2 \times 10 \text{ mg}$ pro 100 g KG in 24 Stunden).

Tab. 6:

		Spezifische Aktivität Aminopyrindemethylase ($\text{nMol} \times \text{mg Prot.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)
Kontrolltiere	n=18	6.3 ± 0.7
Actinomycin D	n=10	5.9 ± 0.5
Aldactone	n=15	10.2 ± 0.6^x
Actinomycin D + Aldactone	n=12	6.2 ± 1.0

Einfluß von Aldactone und Actinomycin D auf die Aminopyrindemethylierung von Rattenleber-
mikrosomen nach 24 Stunden.

n = Anzahl der Tiere.

Signifikanz : $p < 0.01$: x gegen alle Werte der gleichen Spalte.

Dosierung : Aldactone : $2 \times 10 \text{ mg} / 100 \text{ g KG}$. Actinomycin D : $0.15 \text{ mg} / 100 \text{ g KG}$.

Tab. 7:

		Glucose-6-phosphatase	Aminopyrimidinemethylase
Kontrolltiere	n=18	159 $\pm$ 16	6.3 $\pm$ 0.7 ^x
Aldactone.	n=15	162 $\pm$ 18	10.2 $\pm$ 0.6 ^{xx}
Aldosteron	n=10	164 $\pm$ 15	6.0 $\pm$ 0.5 ^x
Aldactone + Aldosteron	n=10	156 $\pm$ 15	10.0 $\pm$ 0.7 ^{xx}

Einfluß von Aldactone und Aldosteron auf mikrosomale Enzyme der Rattenleber nach 24 Stunden.

Spezifische Enzymaktivitäten in nMol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹
n = Anzahl der Tiere.

Signifikanz : p < 0.01: x gegen xx

Dosierung : Aldactone : 2 x 10 mg / 100 g KG. Aldosteron : 0.5 mg / 100 g KG.

E DISKUSSION

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß bei männlichen Ratten die Behandlung mit Spironolacton einen signifikanten Anstieg des oxidativen Arzneimittelabbaues bewirkt. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von LEBER et al. (17) festgestellten signifikanten Anstieg des Cytochrom-P-450-Gehaltes in Rattenleber-Mikrosomen nach Spironolactonvorbehandlung; diesem kommt als mikrosomales Hämoprotein bei der Aktivierung des Sauerstoffs und dessen Einbau in das Substratmolekül bei der mischfunktionellen Oxygenierung eine zentrale Bedeutung zu.

Auch die Beobachtung von SOLYMOSS (1), der bei Spironolactonvorbehandelten Ratten eine Verkürzung der Schlafzeit nach Pentobarbitalgabe feststellte, ist mit unserem Ergebnis zu vereinbaren. Ebenso können die Befunde von KOVACS (2), der in den Leberzellen Spironolactonvorbehandelter Ratten elektronenoptisch eine Proliferation der glatten Membranen des endoplasmatischen Reticulums nachwies, und die von FOUTS (18) festgestellte größere demethylierende Aktivität in glatten Membranen, mit unseren Ergebnissen in Verbindung gebracht werden. Danach wird durch Spironolactonbehandlung eine Vermehrung glatter Membranen, somit ein Anstieg der Aminopyrindemethylaseaktivität hervorgerufen. Die von KOVACS (2) beobachtete gleichzeitig auftretende Abnahme der rauhen Membranen unter Spironolactonbehandlung stimmt dann jedoch nicht mit unserem Ergebnis der Glucose-6-phosphatase-Aktivität überein. DALLNER (8) fand nämlich in den rauhen Membranen höhere Glucose-6-phosphatase-Aktivitäten als in den glatten Membranen. Demnach müßte die Glucose-6-phosphatase-Aktivität unter Spironolactonbehandlung abnehmen. Bei unseren Untersuchungen zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Aktivität dieses Enzyms zwischen vorbehandelten Tieren und Kontrolltieren. Die histologische Beobachtung läßt also keine prinzipielle Aussage über bestimmte Enzymaktivitäten zu.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen die von HORVATH et al. (3), die nach Behandlung mit Spironolacton bei Ratten eine Zunahme des absoluten und relativen Leberfeuchtgewichtes bestimmten. Auch FEILLER et al. (19) konnten, allerdings bei Mäusen, durch Spironolacton eine Zunahme des

Leberfeuchtgewichtes sowie der Ausbeute an Mikrosomenprotein hervorrufen. Bei keiner der von uns gewählten Behandlungsdauer, die sich maximal über 8 Tage erstreckt, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren.

Die von uns beobachtete Aktivitätssteigerung des Enzyms Glucuronyltransferase nach Behandlung mit Spironolacton war bisher nicht bekannt gewesen; ebenso der Befund, daß Etacrynsäure einen Aktivitätsanstieg der Aminopyrindemethylierung bewirkt, der zwar geringer als der nach Spironolacton ist, sich aber auch, wie LEBER (17) feststellte, in einem Anstieg des Cytochrom-P-450-Gehaltes manifestiert. Eine Stimulierung der Glucuronyltransferase durch Etacrynsäure bleibt jedoch aus.

Spironolacton und Etacrynsäure bewirken somit eine spezifische Stimulierung Pharmaka metabolisierender Enzyme, andere mikrosomale Enzyme wie die hier untersuchte Glucose-6-phosphatase werden nicht beeinflusst. Überraschenderweise stimuliert Etacrynsäure nur Enzyme, die zum mischfunktionellen Oxygenierungssystem zu zählen sind.

Durch Behandlung mit Furosemid tritt keine Stimulierung der untersuchten Parameter auf. Somit hat also unter den hier gewählten Untersuchungsbedingungen nicht die gesamte Diuretika-Gruppe einen induzierenden Effekt auf Pharmaka metabolisierende Enzyme, sondern nur Spironolacton und Etacrynsäure, zwei körperfremde Substanzen mit verschiedener chemischer Struktur. Möglicherweise ist der fehlende Induktionseffekt durch die ebenfalls körperfremde Substanz Furosemid dadurch erklärbar, daß diese Substanz nur kurze Zeit im Organismus verweilt (25).

Aus den Kurzzeitversuchen geht hervor, daß keine initiale Hemmung der Aminopyrindemethylase nach Spironolactonbehandlung auftritt, obwohl, wie der in-vitro-Versuch vermuten läßt, Spironolacton selbst Substrat dieses Enzyms ist. Dieser Hemmeffekt wäre nämlich nach vorangegangenen orientierendem in-vitro-Versuch durchaus denkbar gewesen; denn nach in-vitro-Zusatz von Spironolacton, Etacrynsäure, Furosemid bzw. Aldosteron zum Bestimmungsansatz der Aminopyrindemethylaseaktivität zeigt sich der stärkste Hemmeffekt auf den Abbau des Substrats Aminopyrin durch das Enzym Aminopyrindemethylase bei Spironolacton- und Etacrynsäure-Zusatz

mit etwa 60 %iger Hemmung gegenüber etwa 30 %iger Hemmung bei Furosemid- und Aldosteron-Zusatz (unveröffentlicht). Spironolacton und Etacrynsäure scheinen demnach eine größere Affinität zu den mischfunktionellen Oxygenasen zu besitzen und werden möglicherweise von diesen auch in höherem Maße metabolisiert; die Kurzzeitversuche von 2, 4 und 6 Stunden konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen, da hier ein initialer Hemmeffekt hätte erfolgen müssen. Bereits 12 Stunden nach einmaliger Gabe von 10 mg pro 100 Gramm Körpergewicht Spironolacton erfolgt ein signifikanter Anstieg der Aminopyrindemethylierung. LEBER et al. (noch nicht veröffentlicht) stellten das gleiche Verhalten am Cytochrom-P-450-Gehalt der Lebermikrosomen fest. Der maximale Stimulationseffekt ist bei einer Dosis von 2×10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht nach 24 Stunden erreicht, was wiederum mit den Untersuchungen von SOLYMOSS (1) übereinstimmt, denen zufolge bereits 24 Stunden nach Spironolactongabe eine maximale Stimulierung des in-vivo-Abbaues von Pentobarbital zu beobachten ist. Daß 72 Stunden nach Beginn der Behandlung mit 2×10 mg Spironolacton pro 100 Gramm Körpergewicht die Aminopyrindemethylaseaktivität wieder zur Norm abgesunken ist, war bisher nicht bekannt.

Im Unterschied zu anderen induzierenden Substanzen wie etwa 3-Methylcholantren, dessen stimulierender Effekt auf arzneimittelmetabolisierende Enzyme mit einer Änderung der Michaelis-Konstante einhergeht (24), bewirkt Spironolacton lediglich eine Änderung der $V_{\max}$. Der Induktionseffekt beruht folglich nicht wie beim 3-Methylcholantren auf einer erhöhten Affinität von Substrat zum Enzym, sondern auf einer vermehrten Enzymsynthese oder vermindertem Enzymabbau bzw. auf beiden genannten Möglichkeiten; die Hemmversuche mit Actinomycin D sprechen für die erhöhte Synthese. Diese Substanz blockiert sowohl die DNA-Reduplikation als auch die DNA-abhängige m-RNA-Synthese; der ungestörte Ablauf dieser beiden Vorgänge ist nach unseren Versuchen zumindest eine Voraussetzung für den Eintritt eines Induktionseffektes nach Spironolactonbehandlung (26).

Spätere Untersuchungen von SOLYMOSS et al. (20) führten zu dem gleichen Ergebnis; auch sie konnten durch indirekte Bestimmung des Induktionseffektes anhand des Pentobarbitalblutspiegels der Ratten bei gleichzeitiger Behandlung mit Spironolacton und Actinomycin D eine Hemmung der Induktion

erreichen. Dies gelang ihnen auch mit der Hemmsubstanz Cycloheximid (20), wohingegen unsere Hemmversuche mit dieser Substanz daran scheiterten, daß nur nach solchen Cycloheximiddosen, welche bereits die Grundaktivität der Aminopyrindemethylase hemmten, eine Senkung der zusätzlich mit Spironolacton induzierten Enzymaktivität möglich war. Unsere Hemmversuche mit den Substanzen Sanamycin und D-L-Äthionin liefern ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse. Teils ist der Hemmeffekt von Tier zu Tier sehr unterschiedlich, teils die Toxizität der Substanzen so hoch, daß viele Tiere sterben, bevor eine verwertbare Hemmung der Induktion eintritt (RAWER, unveröffentlicht).

Im Gegensatz zu Spironolacton hat das in seiner chemischen Struktur ihm ähnliche Steroid Aldosteron unter den hier gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf die Pharmaka metabolisierenden Enzyme der Rattenleber. Trotz Strukturähnlichkeit der beiden Substanzen erscheint dies verständlich, wenn man annimmt, daß nur diejenige Substanz auf bestimmte Enzyme induzierend wirkt, welche von diesen Enzymen auch metabolisiert wird; denn nach Ansicht von REMMER (5) hydroxylieren die Pharmaka metabolisierenden mischfunktionellen Enzymsysteme kaum körpereigene Substanzen wie z. B. das Steroidhormon Aldosteron, für die spezifische Enzyme mit einer stärkeren Affinität zu ihrem Substrat vorhanden sein sollen. Einer körpereigenen Substanz wie Aldosteron würde also die Fähigkeit zur Induktion eines unspezifischen Pharmaka metabolisierenden Enzymsystems fehlen.

Auch ein Antagonismus zwischen Spironolacton und Aldosteron, wie er im Mineralhaushalt bekannt ist, tritt bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht auf; die Induktion des Enzyms Aminopyrindemethylase nach Spironolacton kann durch gleichzeitige Aldosteronbehandlung nicht aufgehoben werden.

Andererseits konnten PLATT et al. (21) bei der Untersuchung lysosomaler Enzyme der Rattenleber nach Aldosteronbehandlung eine Erhöhung der Enzymaktivität von freier und gebundener β -Acetylglucosaminidase feststellen. Diesen Untersuchungen liegt eine 10mal höhere Tagesdosis von Aldosteron und eine Behandlungsdauer von 4 Wochen bis zu 4 Monaten zugrunde. Ob Aldosteron bei einer so langen Behandlungszeit auch mikrosomale Enzyme stimuliert, wäre Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen.

Für die Verifizierbarkeit des Induktionseffekts durch Spironolacton sind einige Voraussetzungen notwendig. Orientierende Vorversuche zeigten, daß unbehandelte Ratten ab einem Körpergewicht von etwa 200 Gramm eine Aminopyrindemethylaseaktivität besitzen wie jüngere Tiere mit niedriger Normalaktivität nach maximaler Spironolactoninduktion; die Enzymaktivität der älteren, also schwereren Tiere, war mit Spironolacton nicht weiter induzierbar. Vielleicht stellt dieser physiologische Enzymaktivitätsanstieg bei älter werdenden Tieren eine natürliche Induktionsform dar, die durch verschiedenste Substanzen, mit denen die Tiere in Berührung kommen, ausgelöst wird. Auch PLATT et al. (21) stellten bei ihren Versuchstieren fest, daß die elektronenoptisch erfaßbare Proliferation der glatten Membranen in Rattenleber-Zellen nur bei jungen Versuchstiergruppen zu sehen ist. Auch das Geschlecht der Versuchstiere bedingt Unterschiede in der Möglichkeit einer Enzyminduktion durch Spironolacton. STRIPP et al. (22) konnten nur bei weiblichen Ratten eine Schlafzeiterniedrigung unter Hexobarbital-einfluß sowie einen Anstieg des Barbituratabbaus nach Spironolactonvorbehandlung erreichen. Andererseits haben FELLER und GERALD (19) beim Versuchstier Maus keinen Geschlechtsunterschied von verringerter Schlafzeit und vermehrtem Barbituratabbau nach Spironolactonbehandlung feststellen können. Ob Geschlechtsunterschiede in den in dieser Arbeit untersuchten Punkten bestehen, müßte noch untersucht werden.

Nicht zuletzt bestehen erhebliche Schwierigkeiten, die im Tierversuch gefundenen Spironolactoneffekte auch am Menschen zu untersuchen, zu dessen Nutzen Tieruntersuchungen letztlich durchgeführt werden. Direkte Untersuchungsmethoden Arzneimittel metabolisierender Enzyme sind bisher fast ausschließlich dem Tierexperiment vorbehalten, beim Menschen muß meist auf indirekte, weniger sichere Methoden zurückgegriffen werden. Weiterhin liegen die im Tierexperiment von uns gewählten Spironolacton-Dosen um ein Vielfaches höher als die sich nach therapeutischen Gesichtspunkten richtenden Dosen beim Menschen. In Anbetracht solcher erschwerenden Versuchsbedingungen haben bisherige Untersuchungen von LEBER und HARDERS (23) keine dem Tierexperiment vergleichbaren Veränderungen des Pharmakaabbaus nach Spironolactonbehandlung beim Menschen ergeben.

F LITERATURVERZEICHNIS

- 1 SOLYMOSS, B., CLASSEN, H. G., VARGA, S.:
Increased hepatic microsomal activity induced by
Spironolactone and other steroids. Proc. Soc. exp.
Biol. (N. Y.) 132, 940 (1969).
- 2 KOVACS, K., BLASCHECK, J. A., GORDELL, C.:
Spironolactone induced proliferation of Smooth-sur-
faced endoplasmatic reticulum in the liver of rats.
Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin
152, 104 (1970).
- 3 HORVATH, E., SOMOGYI, A., KOVACS, K.:
Einfluß von Spironolacton auf das Regenerationsver-
mögen der Leber bei Ratten. Klin. Wschr. 48, 385
(1970).
- 4 SELYE, H., KRAJNY, M., SANOIE, L.:
Digitoxin poisoning; prevention by Spironolactone.
Science 164, 842 (1969b).
- 5 REMMER, H.: Die Elimination von Arzneimitteln durch enzymatischen
Abbau in der Leber. Der Internist, 8, 413 (1966).
- 6 SCHENKMANN, J. B., FREY, B., REMMER, H., ESTABROOK, R. W.:
Sex differences in drug metabolism by rat liver mi-
crosomes. Molec. Pharmacol. 3, 516 (1967).
- 7 YEUNG, C. Y., FIELD, C. E.:
Phenobarbitone therapy in neonatal hyper-bilirubinae-
mia. The Lancet II, 135 (1969).
- 8 DALLNER, G.: Studies on the structural and enzymic organization
of the membranous elements of liver microsomes.
Acta pathol. microbiol. scand., suppl. 166 (1963).
- 9 SCHNEIDER, W. C.:
Intracellular distribution of Enzymes. III. The oxy-
dation of octanoic acid by rat liver fractions.
J. biol. Chem. 176, 259 (1948).
- 10 POTTER, V. R., ELVEHJEM, C. A.:
Chicago: The Year Book Publishers (1948) Vol. 1,
372 (1948). "Methods in medical research".

- 11 BEISENHERZ, G., BOLTZE, H. J., BÜCHER, Th., CZOK, R.,
GARBADE, K. H., MEYER-ARENDT, E., PFLEIDERER, G.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycero-
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Ka-
ninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).
- 12 BODE, Ch., GOEBELL, H., STÄHLER, E.:
Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Ei-
weißbestimmung mit der Biuret-methode.
Z. klin. Chemie 6, 418 (1968).
- 13 JAKOBSSON, S. V., DALLNER, G.:
Nature of the increase in liver microsomal Glucose-
6-phosphatase activity during the early stages of
Alloxan-induced diabetes.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 165, 380 (1968).
- 14 NASH:
The colorimetric estimation of formaldehyde by
means of the Hantzsch reaction.
Biochem. J. 55, 416 (1953).
- 15 PERONA, G., FREZZA, M., DALLA ROSA, C., SANDRE, G. de:
Dosage method suitable for fragments obtained with
needle biopsy.
Clin. chim. Acta 10, 513 (1964).
- 16 WAERDEN, B. L. van der, NIEVERGELT, E.:
Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels
X-Test und Zeichentest, Berlin-Göttingen-Heidel-
berg, Springer-Verlag (1956).
- 17 LEBER, H. W., RAWER, P., SCHÜTTERLE, G.:
Beeinflussung mikrosomaler Enzyme der Rattenleber
durch Spironolacton, Etacrynsäure und Furosemid.
Klin. Wschr. 49, 116 (1971).
- 18 FOUTS, J. R., WILSON, J. T., GRAM, T. E.: Some characteristics of
hepatic microsomal systems which metabolize Amino-
pyrine in the rat and rabbit. J. Pharm. Exp. Ther. 159,
312 (1967).
- 19 FELLER, D. R., GERALD, M. C.:
Stimulation of liver microsomal drug metabolism
in male and female mice by Spironolactone and Alda-
diene. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 1347 (1971).

- 20 SOLYMOSS, B., KRAJNY, M., VARGA, S., WERRINGLOER, J.:
Suppression by nucleic acid- and protein-synthesis
inhibitors of drug detoxication induced by Spironolac-
tone or Ethylestrenol. J.Pharm.Exp. Ther. 174, 54(1970).
- 21 PLATT, D., PAULI, H.:
Age dependent determinations of lysosomal enzymes
in the liver of Spironolactone and Aldosterone pre-
treated rats. Exp.Geront. Vol. 7, pp.1-7, Pergamon
Press (1972).
- 22 STRIPP, B., HAMRICK, M.E., ZAMPAGLIONE, N.G., GILLETTE,
J.R.:
The effect of Spironolactone on drug metabolism by
hepatic microsomes. J.Pharm.Exp. Ther. 176, 766
(1971).
- 23 LEBER, H.W., HARDERS, A., SCHÜTTERLE, G.:
Untersuchungen zum Einfluß von Aldactone auf Arznei-
mittel abbauende Enzyme im endoplasmatischen Reti-
culum der Leber des Menschen. Verhandlungen der
Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 78, 1358
(1972).
- 24 ALVARES, A.P.:
Alteration of microsomal hemoprotein by 3-methyl-
cholanthrene; effects of ethionine and actinomycine D.
Journ.Pharm.Exp. Ther. 163, 417 (1968).
- 25 GAYER, J.: Die Ausscheidung von Furosemid durch die Niere des
Hundes. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft
für Innere Medizin 70, 702 (1964).
- 26 WATSON, J.D.:
Molecular Biology of the Gene, S. 621, W.A. Benja-
min, Inc., New York (1970).

LEBENS LAUF

Am 28.2.1948 wurde ich in Heidelberg geboren. Nach Besuch der Volksschule und des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Calw legte ich am 26.10.1966 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Freiburg, im Wintersemester 1967/68 das Studium der Veterinärmedizin an der Universität München.

Im zweiten veterinärmedizinischen Semester studierte ich an der Justus-Liebig-Universität Gießen und legte die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Daraufhin wechselte ich unter Anerkennung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung und von zwei veterinärmedizinischen Semestern zum Studium der Humanmedizin über.

Am 10. Juli 1973 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Justus-Liebig-Universität Gießen ab.

Vom 1.10.1973 bis zum 31.10.1974 arbeitete ich als Medizinalassistent.

Herrn Professor Dr. med. G. Schütterle und Herrn Prof.
Dr. med. H. W. Leber danke ich für die Überlassung des
Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit
in der Nephrologischen Abteilung des Zentrums für Innere
Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

